

## ラット下肢筋に対する腱切断の影響に関する組織化学的研究

水口 守 山内 一 功

札幌医科大学整形外科科学講座 (主任 河邨文一郎教授)

蓮見 孝男 高氏 昌

札幌医科大学生理学第1講座 (主任 永井寅男教授)

### Histochemical Study of the Tenotomy Effect in the Rat Leg Muscle

Mamoru MIZUGUCHI and Kazunori YAMAUCHI

*Department of Orthopedic Surgery, Sapporo Medical College*  
(Chief: Prof. B. Kawamura)

Takao HASUMI and Masa TAKAUJI

*Department of Physiology (Section 1), Sapporo Medical College*  
(Chief: Prof. T. Nagai)

The effect of tenotomy on the fibers of rat leg muscles (soleus and tibialis anterior) was studied histochemically with succinic dehydrogenase (SDH) and phosphorylase (PhR) staining. The following results were obtained.

1) Three days to 4 weeks after tenotomy, with the SDH reactions, red and intermediate muscle fibers in the soleus muscle showed a moth-eaten loss of staining reaction in the internal parts of the fibers. Central core/targetoid fibers and target fibers were also observed in the fibers.

2) Three days to 4 weeks after tenotomy, PhR activities of white, red and intermediate fibers in the tibialis anterior muscle merely showed a slight decrease.

3) Morphological changes following tenotomy, especially, muscle atrophy was more markedly observed in the soleus than the tibialis anterior muscle. Three days after tenotomy of both muscles, atrophied and hypertrophied fibers appeared in all types of related fibers.

On the basis of these results, the histochemical and morphological changes following tenotomy were compared with those after denervation.

(Received January 17, 1978 and accepted April 28, 1978)

#### 1 緒 言

前報<sup>1~4)</sup>でわれわれは、ラット下肢筋につき除神経の影響を組織化学的に検討し、phosphorylase 活性が除神経後のより早期に消失する一方、succinic dehydrogenase 活性は後期まで経時的に低下すること、またこの酵素活性の変化に遅れて形態的变化、とくに筋萎縮が著明に現れることを報告した。現在、除神経による筋萎縮は他の原因、たとえば immobilization による廃用性筋萎縮、あるいは腱切断による筋萎縮と異なるとされている<sup>5~7)</sup>。本論文では、前報<sup>1~4)</sup>で得られた成績が、除神経に特異的であるか否かを明らかにする目的で、腱切断による変化を前報<sup>1,2,4)</sup>と同様に組織化学的に検討した。なお腱切断による筋萎縮は、M. soleus において比較的著明であるといわれている<sup>8~10)</sup>ことからこの点にも注目した。

#### 2 実験材料および方法

##### 2.1 材 料

体重 220~270 g の雄または雌の Wister 系ラットを使用し、右側の下肢筋につき腱切断を行ない、反対側を対照とした。なお実験には M. soleus (以下 soleus) および M. tibialis anterior (以下 tibialis anterior) を用いた。

##### 2.2 腱切断の方法

足関節付近で tibialis anterior, extensor digitorum longus ならびに fibularis longus の腱を切断し、その断端を約 1 cm 切除した。また、gastrocnemius および flexor digitorum longus の腱はアキレス腱と一緒に切断し、その断端を約 1 cm 切除した。

##### 2.3 凍結切片の作製

前報<sup>1)</sup>に準じて行なった。

## 2.4 組織化学的方法

Succinic dehydrogenase (SDH) および phosphor-ylase (PhR) 活性の証明法は前報と同様それぞれ Nachlas *et al.*<sup>11)</sup>, Takeuchi and Kuriaki<sup>12)</sup> の方法に準じて行なった。

## 2.5 形態的变化

前報<sup>1)</sup>と同様の方法により、各種筋線維の横断面の形を観察し、さらにこれら筋線維の直径を測定した。

## 2.6 観察期間

腱切断後3日から4週まで観察した。

## 2.7 試薬

Nitro-BT (Sigma), adenosine-5'-monophosphate (和光純薬), glycogen (和光純薬) および  $\alpha$ -D-glucane-1-phosphate 2K Salt (半井化学) を使用し、その他の試薬はすべて市販特級製品を用いた。

# 3 実験成績

対照として用いた正常の soleus および tibialis anterior の SDH 活性に関する成績が Photos. 1-A, 3-A, 5-A および 8-A に示されている。これらの筋に含まれる筋線維の種類, SDH 活性, 形態ならびに内部構造は前報<sup>1,2)</sup>の成績と同様であった。なお, PhR 活性については、この活性が soleus において非常に低いため、本実験では tibialis anterior についてのみ PhR 染色を行なった。

## 3.1 腱切断による SDH 活性の変化

Soleus を用い腱切断後の SDH 活性の変化を観察した。腱切断3日後 (Photo. 1-B), 一部の赤筋ならびに中間型線維において, SDH 活性は対照と同様に高かったが, その分布は線維の横断面全体に一樣ではなく部分的に欠損し, いわゆる moth-eaten 状の活性欠損を示した。腱切断1~2週間後になると (Photo. 2), SDH 活性の強さならびにその分布が種々に変化した。すなわち, 筋線維周辺部の活性は正常であるのに中心部で増強あるいは失活しているもの, 筋線維の中心部と周辺部の境界で活性が著しく高いもの, および筋線維の横断面全体にわたり SDH 活性が著明に増強されているものなどが認められた。Photo. 3 には, さらにこれらの筋線維を高倍率 ( $\times 2100$ ) 下で観察した成績を示す。これによると, 対照 (Photo. 3-A) において著明に示された network 構造は腱切断2週間後にはほとんど消失し, 筋線維中心部の SDH 活性がとくに著明に増強されていた。Engel *et al.*<sup>10)</sup> は, 筋線維中心部の各種 oxidative enzymes あるいは PhR 活性の欠損を呈する筋線維を central core/targetoid fibers と称し, また, 筋線維中心部の活性は消失するが周辺部のそれは正常, しかも中心部と周辺部の境界で活性の著しく増強している筋線

維を target fibers とよんでおり, さらに, この target fibers は soleus だけに認められるという。上述のように, われわれの成績においても, 明らかに central core/targetoid fibers および target fibers が認められた (Photos. 1, 2 および 3)。腱切断3~4週間後 (Photo. 4) では, 筋線維内部全体にわたり SDH 活性が著明に増強された筋線維, ならびに granular 状の活性欠損を示す筋線維が多数認められた。

以上は soleus に関する成績であるが, これに対し tibialis anterior においては腱切断3日後 (Photo. 5-B), 赤筋および中間型線維ではそれらの SDH 活性は対照と同様に高く, また soleus の場合と同様に moth-eaten 状の欠損を示したが, 白筋線維では腱切断による変化は明瞭でなかった。また腱切断1~4週間後 (Photos. 6 および 7) では主として赤筋および中間型線維において SDH 活性が軽度増強されているもの, あるいは筋線維内部全体にわたり SDH 活性が granular 状の欠損を呈しているものが認められた。一方, 白筋線維では SDH 活性が線維の横断面全体にわたり一様でなく, 部分的に低下あるいは軽度増強されていた。また高倍率 ( $\times 2100$ ) 下で SDH 活性により示された network 構造は (Photo. 8), 赤筋, 白筋, および中間型線維のいずれにおいても消失したが, 赤筋および中間型線維では diformazan 顆粒が融合し大きな集団を形成している部分が認められた。

## 3.2 PhR 活性に対する腱切断の影響

なお成績には示さなかったが, 腱切断後3日から4週間までの間で, tibialis anterior の各種筋線維の PhR 活性は軽度の低下を示すにすぎなかった。また, PhR 活性で示された network 構造はほぼ完全に維持され, network 内の小区画の狭小化ないし拡大は認められなかった。

## 3.3 腱切断による形態的变化

Soleus における腱切断後の筋線維の太さ (diameter) の変化を測定し, これにより筋線維が萎縮あるいは肥大する様子を観察した (Figs. 1, 2 および 3)。成績から明らかなように, 腱切断3日後 (Photo. 1-B 参照) から, 萎縮した筋線維および肥大した筋線維が認められ, 2週間後 (Photo. 2 参照) では萎縮線維が比較的多く観察された。また, 4週間後 (Photo. 4) では萎縮線維と同様肥大線維も多く見られるようになった。Tomanek and Cooper<sup>13)</sup>によれば, guinea-pig soleus の筋線維の太さは腱切断後著明に減少するが, その後徐々に回復して90日経過すると対照のそれよりもやや太くなるという。本成績においてもほぼ類似の傾向が認められた。

一方, tibialis anterior においても腱切断3日後から各種筋線維に萎縮線維および肥大線維が認められた (Fig. 4)。

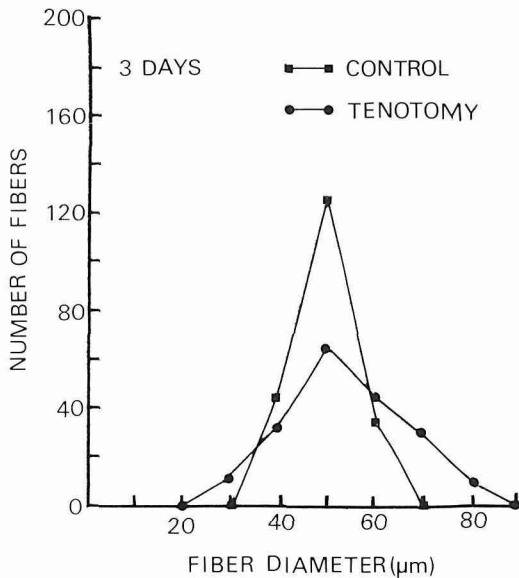


Fig. 1 Histogram of the diameter of fibers in rat soleus muscle tenotomized for 3 days. A reduction or increase in the diameters of the fibers is shown. In the control and tenotomized muscles, the total number of red plus intermediate fibers measured is 200, respectively.

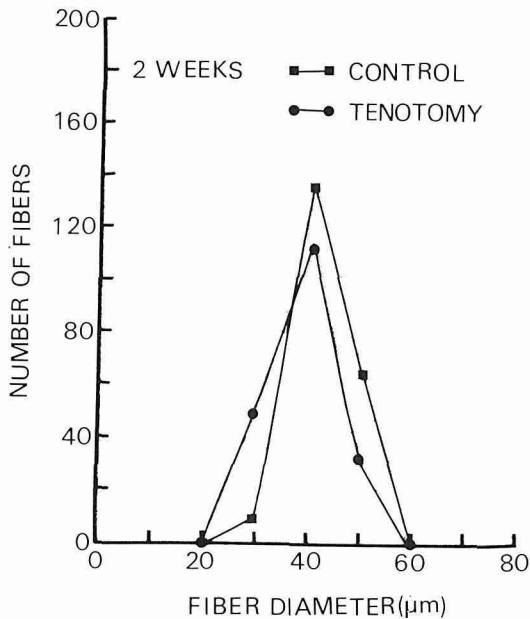


Fig. 2 Histogram of the diameter of fibers in rat soleus muscle tenotomized for 2 weeks. The tenotomized soleus muscle shows reduction in the diameters of the fibers. Other explanations are as for Fig. 1.

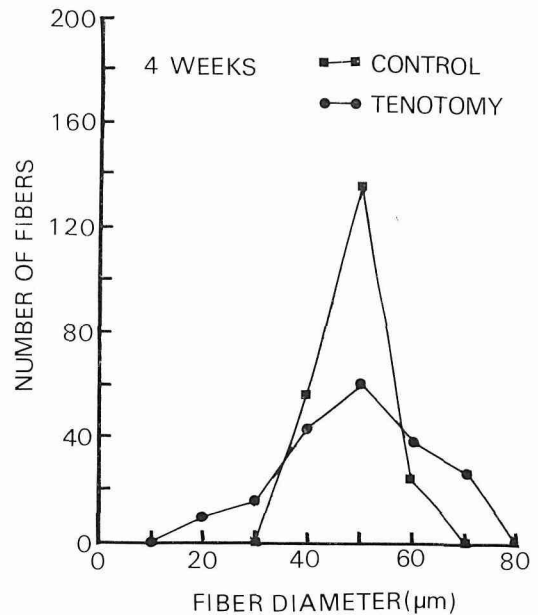


Fig. 3 Histogram of the diameter of fibers in rat soleus muscle tenotomized for 4 weeks. There is a reduction or increase in the diameters of the fibers. Others as for Fig. 1.

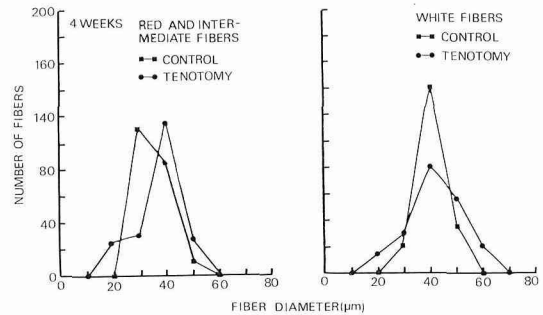


Fig. 4 Histograms of the diameter of fibers in rat tibialis anterior muscle tenotomized for 4 weeks. All types of the fibers show a reduction or increase in the diameters of fibers. In the control and tenotomized muscles, the total number of all types of fibers measured is 200, respectively.

これらの筋線維は、筋の横断切片全体に一樣に分布するのではなく、部位により異なっていた。この成績は、Ferguson *et al.*<sup>14)</sup> のそれと一致する。

#### 4 考 察

##### 4.1 代謝酵素に対する腱切断の影響

本成績において (Photos. 5-7), 腱切断により, tibialis

anterior の白筋線維では SDH 活性がほとんど変化しないかまたは軽度増強された。一方, tibialis anterior ならびに soleus に含まれる SDH 活性の高い赤筋および中間型線維では, 大部分において moth-eaten 状ないし granular 状の活性欠損を生じ, またこれら筋線維の一部においては筋線維の横断面全体の活性がむしろ増強される場合のあることも示された。これらの活性欠損部は mitochondria の変性脱落部分とみなされており<sup>10,13,20</sup>, また本成績において高倍率 (Photo. 8-B) 下で明らかに diformazan 顆粒の融合が認められたが, この顆粒は mitochondria の分布に対応する<sup>21,22</sup> ことも知られている。これより, 腱切断は mitochondria の構造に対し著明な影響を与えることが示唆される。このことは, 腱切断筋を電子顕微鏡的に観察し, mitochondria の変性が著しいことを示した Tomanek and Cooper<sup>13</sup> および Shafiq<sup>20</sup> の報告によっても支持される。

Engel *et al.*<sup>10</sup> は, 腱切断後のネコの soleus を組織化学的に検討し, 特徴的所見として, target fiber, central core fiber ならびに nemaline rod fiber (trichrome 染色で筋線維内に赤色の rod 形成が見られ, また SDH, PhR および ATPase 活性はともにこの部で不染性の spot を生ずることが知られている) の出現をあげている。本実験においては, target fiber および central core fiber を認めたが, 典型的な nemaline rod は認められなかった。しかし, これはおそらく, trichrom 染色を併用することにより明瞭に現れるものと思われる。従来 target fiber は, 人の neuromuscular disease の場合に観察されることから, 一般に除神経筋の一徴候とされている<sup>10,15</sup>。また central core fiber および nemaline rod についても, それぞれ central core myopathy および nemaline myopathy において認められているが, Shafiq<sup>20</sup> は central core ならびに nemaline myopathy に特徴的な変化が腱切断によっても形成され得ることを電子顕微鏡的に示し, これにもとづき, これらの変化が上の myopathy に特異的でないことを指摘した。同様の結果を組織化学的に示したわれわれの以上の成績は Shafiq<sup>20</sup> のこの見解を支持する。

PhR 活性については, 腱切断 4 週後でもその活性の低下は軽度であった。Engel *et al.*<sup>10</sup> によれば, 腱切断により PhR 活性は一時的に痕跡程度まで低下するが, その後活性は徐々に回復して対照のそれとほとんど等しくなるという。この現象について彼らは, 切断された腱が周囲の軟部組織と癒着し, 筋の機能が回復するために腱切断による廃用性筋萎縮ならびにその他の二次的な変化は不完全になると考えている。しかしこの詳細については現在なお明ら

かでない。

筋線維の酵素活性の変化は, 種々の原因で起こることはよく知られている。除神経ならびに腱切断による酵素活性の変化について組織化学的所見を比較してみると, 前報<sup>1,2,4)</sup> で報告したように除神経により SDH ならびに PhR 活性は経時的に低下するが, その低下の程度は PhR 活性で著明であった。これに対し腱切断の場合には SDH ならびに PhR 活性が経時的に低下することではなく, SDH 活性においては同じ種類の筋線維でも横断面の部位により上述のような種々の活性変化が認められた。除神経筋ならびに腱切断筋におけるこれらの特徴的な変化については, 後述のように前者は神経の栄養支配の遮断に由来し, 後者は筋の張力の消失に起因するものと思われる。

#### 4.2 腱切断による形態的变化

従来, 腱切断による筋萎縮については多くの報告<sup>8,10,13,14</sup>があるが, これらによれば, 一般に soleus において筋萎縮が強く現れるという。本実験の成績においても (Figs. 1, 2, 3 および 4), 腱切断による筋萎縮は tibialis anterior よりも soleus においてははるかに著明であった。この理由については現在十分明らかでないが, soleus は long lasting あるいは sustained activity を有し<sup>23</sup>, 腱切断により最も影響され易い mitochondria を多量に含むことと関係があるのかも知れない。また, 本実験の tibialis anterior の成績では腱切断により赤筋, 白筋および中間型線維のいずれの筋線維においても萎縮線維と肥大線維が観察された。しかも, この両筋線維の分布は横断面の部位により異なっていた。おそらく, これは切断された腱の断端がその後, 周囲の軟部組織と癒着する程度に依存し mechanical tension を速く回復した部位に肥大線維が存在するものと思われる。また, Ferguson *et al.*<sup>14</sup> もウサギ下肢筋の immobilization に関する実験において, 足関節が屈曲位にあるか伸展位にあるかにより tibialis anterior における肥大線維出現の程度が異なり後者で大きいことを報告しているが, この事実は上の考えを支持する。

除神経および腱切断による筋線維の太さの変化を比較すると, 前報<sup>1)</sup> で報告した除神経による太さの変化は, 白筋, 赤筋および中間型線維において経時的に減少する傾向を示し, とくに除神経 2~3 週以後では白筋線維の太さの減少が著明であった。一方, 腱切断による太さの変化については, 各種筋線維において腱切断 3 日後よりすでに萎縮線維および肥大線維が認められた (Figs. 1, 3 および 4)。

Schiaffino and Hanzlikova<sup>24</sup> によれば, 腱切断後に観察される線維の肥大は, innervation とは無関係であり, 筋への張力の直接作用がより重要な因子であるという。また Gutmann *et al.*<sup>25</sup> によれば, mechanical tension が

筋線維の代償性肥大をひき起こす主な要因であるとし、また、Eccles<sup>8)</sup>は腱切断による筋萎縮は筋線維が有効な張力を発生し得ないために起こるという。さらに、immobilization 後にみられる筋線維の萎縮および肥大は血流の増加を伴うことも報告されている<sup>14)</sup>。これらを考慮すると、本実験で示された腱切断による形態変化および組織化学的变化は、mechanical tension の消失とこれに伴う循環障害に起因するものと思われる。一方、除神経によるこれらの変化は、immobilization による廃用性筋萎縮あるいは腱切断などによる筋萎縮とは異なり、運動神経の特殊な栄養支配の消失に因ると考えられる。これに関連して最近、Kark *et al.*<sup>26)</sup> は、除神経による筋萎縮と廃用性筋萎縮の差について、前者は酸化的代謝速度の減少を伴うが後者はこれを伴わないことを指摘し、soleus における酸化的代謝過程に対する神経の特殊な作用、おそらくは神経が mitochondria 内のある種の酵素に直接作用しこれを調節する可能性を示唆している。

以上、腱切断筋におけるこれらの変化は、前報<sup>1~4)</sup>で得られた除神経における組織化学的ならびに形態的变化と明らかに異なることが示された。

## 5 要 約

ラット下肢筋の soleus および tibialis anterior に対する腱切断の影響を、SDH ならびに PhR 活性の面から組織化学的に検討し、以下の成績を得た。

5.1 腱切断3日～4週後、soleus の赤筋ならびに中間型線維の SDH 活性は moth-eaten 状の欠損を示し、また central core/targetoid fibers ならびに target fibers の出現を認めた。

5.2 腱切断3日～4週経過しても tibialis anterior の各種筋線維の PhR 活性は軽度低下するにすぎなかった。

5.3 腱切断による形態的变化とくに筋萎縮は、tibialis anterior よりも soleus において著明であった。両者において、腱切断3日後から各種筋線維に萎縮線維および肥大線維が認められた。

以上の成績にもとづき、腱切断および除神経による組織化学的ならびに形態的变化の差について述べた。

## 文 献

1. 水口 守, 高氏 昌: ラットの赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響に関する組織化学的研究. I. Succinic Dehydrogenase 活性について. 札幌医誌 **46**, 262-276 (1977).
2. 水口 守, 高氏 昌: ラットの赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響に関する組織化学的研究. II. Phosphorylase 活性について. 札幌医誌 **46**, 277-282 (1977).
3. 水口 守, 高氏 昌: ラットの赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響に関する組織化学的研究. III. ATPase 活性について. 札幌医誌 **46**, 283-290 (1977).
4. 水口 守, 高氏 昌: ラットの赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響に関する組織化学的研究. IV. 除神経後早期の変化について. 札幌医誌 **46**, 333-340 (1977).
5. Guth, L.: "Trophic" influences of nerve on muscle. *Physiol. Rev.* **48**, 645-687 (1968).
6. 永井寅男, 高氏 昌, 竹田 真, 河邨文一郎, 高橋延勝, 佐々木元賢, 北 進一: Trophic innervation の本質について. 札幌医誌 **44**, 104-106 (1975).
7. Gutmann, E. and Hnik, P.: Denervation studies in research of neurotrophic relationships. In: Gutmann, E.: *The Denervated Muscle*. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (1962).
8. Eccles, J. C.: Investigations on muscle atrophies arising from disuse and tenotomy. *J. Physiol.* **103**, 235-266 (1944).
9. McMin, R. M. H. and Vrbova, G.: Morphological changes in red and pale muscles following tenotomy. *Nature* **195**, 509 (1962).
10. Engel, W. K., Brooke, M. H. and Nelson, P. G.: Histochemical studies of denervated or tenotomized cat muscle: Illustrating difficulties in relating experimental animal conditions to human neuromuscular diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **138**, 160-185 (1966).
11. Nachlas, M. M., Tsou, K. C., DeSouza, E., Cheng, C. S. and Seligman, A. M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420-436 (1957).
12. Takeuchi, T. and Kuriaki, H.: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 153-190 (1955).
13. Tomanek, R. J. and Cooper, R. R.: Ultrastructural changes in tenotomized fast- and slow-twitch muscle fibers. *J. Anat. (Lond.)* **113**, 409-424 (1972).
14. Ferguson, A. B., Vaughan, L. and Ward, K.: A study of disuse atrophy of skeletal muscle in the rabbit. *J. Bone and Joint Surg.* **39-A**, 583-596 (1957).
15. Adams, R. D.: Pathology of muscle diseases. Spinal and neural muscular atrophies. In: *Diseases of Muscle, Part III, Chapter 10*, 419-450,

- Harper and Row Publishers. Hagerstown, Maryland, New York, Evanston, San Francisco, London (1975).
16. Shy, G. D. and Magee, K. R.: A new non-progressive myopathy. *Brain* **79**, 610-621 (1956).
  17. Dubowitz, v and Pearse, A. G. E.: Oxidative enzymes and phosphorylase in central-core disease of muscle. *Lancet* **2**, 23-24 (1960).
  18. Engel, W. K., Foster, J. B., Hughes, B. P., Huxley, H. E. and Mahler, R.: Central core disease-an investigation of a rare muscle cell abnormality. *Brain* **84**, 167-185 (1961).
  19. Shy, G. M., Engel, W. K., Somers, J. E. and Wanko, T.: Nemaline myopathy- a new congenital myopathy. *Brain* **86**, 793-810 (1963).
  20. Shafiq, S. A.: Tenotomy. Effect on the fine structure of the soleus of the rat. *Arch. Neurol.* **20**, 625-633 (1969).
  21. Stein, J. M. and Padykula, H. A.: Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Am. J. Anat.* **110**, 103-123 (1962).
  22. Padykula, H. A. and Gauthier, G. F.: Cytochemical studies of adenosine triphosphatases in skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* **18**, 87-107 (1963).
  23. Peachey, L. D.: Muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **30**, 401-440 (1968).
  24. Schiaffino, S. and Hanzlikova, V.: On the mechanism of compensatory hypertrophy in skeletal muscles. *Experientia* **26**, 152-153 (1970).
  25. Gutmann, E., Schiaffino, S. and Hanzlikova, V.: Mechanism of compensatory hypertrophy in skeletal muscle of the rat. *Exp. Neurol.* **31**, 451-464 (1971).
  26. Kark, R. A. P., Edgerton, V. R. and Whiteman, N.: Decreased oxidation by muscle after denervation but not disuse atrophy. In: Bradley, W. G., Gardner-Medwin, D. and Walton, J. N.: Recent Advances in Myology. 33-41, Proceedings of the Third International Congress on Muscle Diseases. Newcastle upon tyne, 15-21 September, 1974. Excerpta Medica, Amsterdam, American Elsevier Publishing Co. Inc., New York (1975).

### Explanation of photographs

- Photo. 1** 1-A: Normal soleus muscle of the rat, cross-section, succinic dehydrogenase (SDH).  $\times 220$   
 1-B: Tenotomized soleus muscle, 3 days, cross-section, SDH. Note change in diameter of muscle fibers and a moth-eaten loss of staining reaction in the internal parts of the fiber.  $\times 220$
- Photo. 2** Tenotomized soleus muscle, 2 weeks, cross-section, SDH. Some fibers with central loss (central core/targetoid fibers) or increase in SDH activity are found and others show a marked increase in SDH activity in the internal parts of the fiber (target fibers).  $\times 220$
- Photo. 3** 3-A: Detailed view of normal soleus muscle fibers, cross-section, SDH. The interfibrillar network structure is formed by the high enzymatic activity.  $\times 2100$   
 3-B and 3-C: Detailed view of tenotomized muscle fibers with central loss or increase in SDH activity, 2 weeks after tenotomy, cross-section. See text for the detailed explanation and compare with Photo. 3-A.  $\times 2100$
- Photo. 4** Tenotomized soleus muscle, 4 weeks, cross-section, SDH. Note a granular defect or marked increase in SDH activity in some fibers.  $\times 220$
- Photo. 5** 5-A: Normal tibialis anterior muscle, cross-section, SDH.  $\times 220$   
 5-B: Tenotomized tibialis anterior muscle, 3 days, SDH. Red and intermediate fibers show a moth-eaten defect in SDH activity.  $\times 220$
- Photo. 6** Tenotomized tibialis anterior muscle, 4 weeks, cross-section, SDH. Note decrease in diameter of white fibers and a granular loss of the SDH staining in a part of the red and intermediate fibers.  $\times 220$
- Photo. 7** Tenotomized tibialis anterior muscle, 4 weeks, cross-section, SDH. The enzymatic activity in the red and intermediate fibers is increased, and some white fibers are hypertrophic and red and intermediate fibers are atrophic. Compare with Photo. 5-A.  $\times 220$ .
- Photo. 8** 8-A: Detailed view of normal tibialis anterior muscle fibers, cross-section, SDH. The interfibrillar network structure is formed by the high enzymatic activity.  $\times 2100$   
 8-B: Detailed view of tenotomized tibialis anterior muscle, 4 weeks, cross-section, SDH. The interfibrillar network structure in all types of fibers is disappeared completely and the diformazan particles are in clusters. Compare with Photo. 8-A.  $\times 2100$



